

アレルギー性鼻炎における神経ペプチド、 サブスタンスPの関与に関する研究

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任：古川 仍教授)

加 藤 千 維 子

(平成3年1月14日受付)

モルモットを使用してアレルギー性鼻炎モデルを作成し、アレルギー性鼻炎に関するサブスタンス P (substance P, SP) の関与を検討した。ハートレー系モルモットに、卵白アルブミン (ovalbumin, OA) を抗原として2週間隔で2回腹腔内投与し、21日目から1日1回10分間 OA を吸入させ、アレルギー性鼻炎モデルを作成した。また、知覚神経を変性させ SP を枯渇させる作用を有するカプサイシンを腹部皮下に注入し、その後に感作を行って作成したアレルギー性鼻炎モデルモルモットにおいて、鼻症状、鼻粘膜の細胞間隙の透過性、IgE 産生についてカプサイシンを投与していないモデルと比較した。鼻粘膜の細胞間隙の透過性には horseradish-peroxydase (HRP) をトレーサーとして用いた実験を行い、IgE 産生の評価には受身皮膚アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) を行った。吸入感作の際に2群をさらにヒスタミンを点鼻する群としない群にわけ、SP とヒスタミンとの関係も併せて検討した。その結果、SP 存在群と非存在群の間では症状に明らかな解離を認め、SP 消失群にヒスタミンを点鼻しても症状は増強を示さず、アレルギー性鼻炎モデルにおける鼻症状は、主として SP 陽性知覚神経によって起こると考えられた。吸入感作のみ行った群では細胞間隙の透過性亢進は吸入感作開始3日目から認められたが、SP 消失群にヒスタミンを点鼻しなかった群では、鼻粘膜細胞間隙の透過性の亢進は観察期間を通してみられず、SP 消失は透過性亢進に抑制的に働くと考えられた。SP 存在下にヒスタミンを点鼻した群は1日目から亢進がみられる一方、SP 消失群にヒスタミンを点鼻した群では3日目からみられるものの前者とは有意差を認めた。このことからヒスタミンも細胞間隙の透過性を亢進させる作用を有するが、SP が存在しない状態ではその作用は減弱すると考えられた。吸入感作を繰り返すことによって、SP 存在下にヒスタミンを投与していないモルモットの PCA 価は有意に連続的に上昇した。一方、SP が消失したモルモットの PCA 価は低く、SP 存在群との間に有意差を認めた。SP 消失群のうち、ヒスタミンを点鼻した群としない群では鼻粘膜透過性は常に有意差を認めるものの、PCA 価は有意差を一定して認めないことから、SP 消失による PCA 価の低下は細胞間隙透過性の低下の結果ではなく、その他の機序が考えられた。よって IgE 産生に対しても SP 陽性知覚神経が関与することが明らかとなった。このようにアレルギー性鼻炎において鼻症状、鼻粘膜透過性さらに IgE 産生に関しても SP 陽性知覚神経は何等かの役割を果たすものと考えられた。

Key words nasal allergy, substance P, permeability of nasal mucosa, IgE

気道粘膜は外界の刺激に直接晒されており、生体防御機構の第一線としての機能を担っている^{1)~3)}。その防御機構の一つとして、粘膜上皮の細胞間隙が形成す

る緻密接合が、異種蛋白の粘膜下侵入に対して防御的に機能することが、horseradish-peroxydase (HRP) を用いた研究から示唆されている。一方、ヒスタミ

Abbreviations: ABC, avidin-biotin peroxydase complex; HRP, horseradish-peroxydase; OA, chicken ovalbumin; PBS, phosphate buffer saline; PCA, passive cutaneous anaphylaxis; SP, substance P; TDI, toluene diisocyanate

ン⁴、外科的侵襲⁵、電気刺激⁶、タバコの煙⁷等の刺激は緻密接合の防御機構を低下させ、刺激物質の粘膜基底層への透過を容易にし、基底層に豊富に存在する肥満細胞への作用を増強する。I型アレルギー反応においても、抗原物質の刺激が関与した緻密接合の防御機構の低下の結果による細胞間隙の透過性の亢進を、Boucher⁸らは気管粘膜において、Inagaki⁹らは鼻粘膜においてそれぞれ報告している。

アレルギー性鼻炎における細胞間隙の透過性亢進の機序に関する研究では、まず鮫島ら¹⁰はモルモットを用いたアレルギー性鼻炎モデルでフリーズ・フラクチャー法による実験を行い、膜内粒子や緻密接合の構成に形態学的な変化はみられず、細胞間隙の形態的な変化による透過性亢進の可能性を否定している。また、金ら¹¹は同様にアレルギー性鼻炎モルモットを作成し、HRP 標識レクチンを用いて細胞膜における複合糖脂質の変化を観察した結果、正常群との間に有意差がないことを報告し、細胞膜表面の組成の変化による透過性の亢進の可能性を否定しており、機能的な変化によるものと推測している。しかしながら、細胞間隙の透過性亢進に関して直接的な変化を示す報告はない。細胞間隙の透過性亢進を誘発する物質は、同時に知覚神経終末を刺激する物質であることから、粘膜緻密接合機能低下に対する神経系の関与が最近注目されている。実際、Widdicombe¹²は知覚神経反射による透過性亢進のメカニズムに対する仮説を提唱している。鼻の知覚を支配する三叉神経の自由終末はC線維を経由し鼻粘膜上皮内までみられ、その神経伝達物質がサブスタンス P (substance P, SP) であることは多くの研究で明らかになっている¹³。SPは11個のアミノ酸からなるペプチド¹⁴で、tachykininに属し三叉神経節内にも多く存在し、鼻粘膜では主に上皮内、上皮下にみられる^{15,16}。

カプサイシンは赤唐がらしに広く含まれている刺激物質であり局所に加えると下気道においてはC線維の神経終末を活性化し、SPを放出すると報告されている¹⁷。同様にカプサイシンを鼻内に投与すると、瞬時にくしゃみ、水様性鼻漏などの鼻症状が発現し、血管の透過性が増し鼻閉を起こす¹⁸。しかしながら、カプサイシンを全身投与した動物では三叉神経節と鼻粘膜内のSP陽性細胞が消失しており¹⁹、鼻の刺激物質、例えばタバコの煙²⁰やtoluene diisocyanate (TDI)²¹を吸入させても、明かな鼻刺激症状は発現しない。このように全身投与されたカプサイシンは三叉神経を刺激してSPを放出させ、三叉神経節からSPを枯渇させてしまう神経毒を有すると考えられている。同様にカ

プサイシン処置した動物でTDIを用いて鼻前庭を刺激した研究でヒスタミン遊離の低下が報告され、知覚神経を介したヒスタミンの放出が示唆されている²²。また谷ら²³はヒスタミンを点鼻すると三叉神経節内のSPは減少するのに対しm-RNAの量には変化を認めなかったことから、ヒスタミンによって三叉神経の自由終末が刺激され、順行性に刺激が三叉神経節に伝わり逆行性の軸索輸送によってSPが三叉神経節から鼻粘膜に放出されると報告した。また、Lundberg²⁴は同様に鼻粘膜ヒスタミンの局所投与によってSPが知覚終末から放出され、鼻粘膜内のSP含有量が増加する事をラジオイムノアッセイ法を用いてSPを定量する事により証明した。このようにヒスタミンとSPの間には知覚神経が関与する密接な関係が存在する。

本研究ではアレルギー性鼻炎のモデル動物を用いてアレルギー性鼻炎における細胞間隙の透過性の亢進がSP陽性知覚神経の反射によって起こる可能性の有無を検討した。また、アレルギー性鼻炎とタバコやTDIによる刺激でみられる鼻過敏感症の大きな相違点の一つはIgE産生の有無であるが、IgE産生に対する知覚神経の関与については今だ報告がなく、本研究ではSP陽性知覚神経に特異的に作用するカプサイシンをアレルギー性鼻炎のモルモットに投与し、知覚神経がIgE産生に与える影響を検討した。

材料および方法

I. 実験材料

雌のハートレー系モルモット (体重 200g~250g) を能動感作動物として用いた。また、同様に雌のハートレー系モルモット (体重 300g 前後) を受身皮膚アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 反応を行う被検動物として用いた。能動感作モルモットはカプサイシン、ヒスタミン処置の組合せによって4群に分けられ、合計65匹用いた (表1)。

II. 実験方法

1. 感作方法

抗原として卵白アルブミン (chicken ovalbumin, OA) (two crystalized, 生化学工業, 東京) を用いた。OA 10 μ g と、dl-propranolol HCl (Sigma, St. Louis, USA) 20mg/kg を生理食塩水で溶解して腹腔内感作を行った。第1回腹腔内感作後14日目に、同量の溶液をブースターとして腹腔内に投与し、2回目の感作を行った。その1週間後 (感作21日目) からOAを1mg/mlの濃度で溶解した生理食塩水を吸入抗原とし、ジェット式吸入器を用いて0.75気圧で1日に1回10分間吸入させた。吸入に際してアクリル性吸入箱

(200mm×300mm×150mm) を作製し、1側に吸入器を取り付け、対側と上面に排気口を設けた箱の中にモルモットを入れて吸入させた。

2. カプサイシンの投与方法

武田の方法²¹⁾に準じて抗原感作の前に capsaicin (和光純薬, 大阪) を 10% ethanol, 10% polyoxyethylen (20) sorbitan monooleate (和光純薬) にて溶解し、5日間連続で漸増し合計 950mg/Kg (50, 100, 200, 200, 400mg/kg/day) をモルモットの腹部皮下に投与した。カプサイシンを投与しない群には溶媒のみを等量皮下注入した。

3. ヒスタミンの点鼻方法

燐酸ヒスタミン (和光純薬) を 5mg/ml の濃度で生理食塩水に溶解し、腹腔内感作動物の吸入感作に先立ち、毎回 20 μ l をマイクロピペットを用いて一側づつ点鼻した。吸入感作は点鼻20分後に開始した。

III. 測定項目及び評価方法

1. 症状スコア

吸入感作開始後10分間の症状を観察し、武田の方法²¹⁾に準じてくしゃみの回数、鼻汁分泌の有無、喘鳴発作の有無、呼吸困難の程度をそれぞれ無症状から重症まで4段階にわけて判断した。4項目を合計した点数をその日の症状スコアとし、各日、各群の平均と標準偏差を算出し各群を比較した (表2)。統計学的処理

Table 1. Grouping of the guinea pigs

Treatment Group	Capsaicin ¹⁾	Histamine ²⁾	Animal number
Group A	— ³⁾	—	20
Group B	—	+ ⁴⁾	15
Group C	+	—	15
Group D	+	+	15

Guinea pigs were divided in four groups (A, B, C and D) according to the treatment shown in this table.

1) Capsaicin was injected intracutaneously 950 mg/kg in total for 5 days.

2) 0.1 mg of histamine diphosphate was delivered to bilateral noses before inhaling ovalubumin.

3) Negative (—); no treatment

4) Positive (+); treatment

Table 2. Symptom score

Grade	0	1	2	3
Check point				
Frequency of sneeze	0	1-4	5-11	11<
Watery rhinorrhea	—	in nasal cavities	around noses	out of noses
Frequency of stridor attack	—	1-2	3-5	5<
Dyspnea	—	slightly	cyanosis	collapse

Symptoms were observed during an inhalation period for 10 min and valued in four grades from 0 to 3 for each guinea pig according to Takeda's score board shown in this table.

には、2元配置分散分析の後、Turkey-Kramer による多重比較を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

2. 細胞間隙の透過性についての検討

Horseradish-peroxydase (HRP) (東洋紡績, 東京) をトレーサーとして用いて鼻粘膜の透過性を検討した。それぞれの群から無作意に選んだ3匹をペントバルビタール麻酔下 (30mg/kg) に気管を露出した。喉頭から約 3mm のところに気管口を設け、その口側を絹糸にて結紮し誤嚥、窒息を防いだ。生理食塩水 1ml で両鼻腔内を洗浄後、HRP 10mg を生理食塩水 0.3ml に溶解して一側鼻に対して 0.15ml づつ両側に点鼻した。点鼻15分後に 2% グルタルアルデヒド、2% パラホルムアルデヒドを含む 0.1M 磷酸緩衝食塩液 (pH 7.4) (phosphate buffer saline, PBS) にて灌流固定後、鼻中隔を中隔軟骨とともに採取し、同固定液で後固定 (4°C, 3hr) を行った。両側の鼻中隔粘膜を中隔軟骨から剝離して取り出し、0.1M PBS に20分間浸漬して固定液を洗浄した。HRP を発色させるために 3, 3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) (同仁化学研究所, 熊本) 20mg を tris buffer 50ml に溶解後 3% H_2O_2 を 50 μ l 加えた Karnovsky 溶液²⁰で鼻中隔粘膜をホルマウント標本として10分間反応を行った。反応後標本を2分し、光学顕微鏡用標本と電子顕微鏡用標本を作製した。光学顕微鏡用標本は、パラフィン包埋し、4 μ m の切片を作成しヘマトキシリン (Mayer's hematoxylin, 和光純薬) 染色を行った。電子顕微鏡用標本はエポン812 (同研商事, 東京) にて包埋後超薄切片を作製し H-400 電子顕微鏡 (日立, 東京) で観察した。細胞間隙の透過性を評価するために、光学顕微鏡下で細胞間隙を130から340数え、そのうち

HRP 反応物質が認められる細胞間隙の割合を算出した。統計学的処理には X^2 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

3. IgE 産生の評価

Parish の方法²⁰により PCA 価を求めて IgE 産生の程度を評価した。吸入終了2時間後にすべてのモルモットからペントバルビタール麻酔下 (30mg/kg) に心臓血を左心室から 2ml 採取し、20分間室温で静置後、2000G \times 20 分間遠心して血清を分離、その血清 0.2ml を生理食塩水で2倍から256倍まで2倍数希釈した。

体重 300g 前後の雌のハートレー系モルモットの背部を、動物用電動バリカン、アニマルクリッパー Model 900 (大東電気, 東京) を用いて剃毛し、背部に 3cm 間隔に2倍数希釈した血清の4倍希釈から256倍希釈まで各々 0.1ml づつを皮内に注入した。8日後にペントバルビタールにて全身麻酔下に上腕の静脈を露出させ OA 4mg/ml 生理食塩水と 1% Evans Blue (和光純薬) 生理食塩水を 0.5ml づつ混合した液を静注した。30分後に断頭し背部の皮膚を剝離、内面から簡易ノギスをあてて反応の直径を測定し、直径 5mm 以上の青色斑を示す最終希釈を反応の PCA 価として記録した。各日各群の \log_2 PCA 価の平均を求め、対数表にて PCA 価に換算した。検定には2元配置分散分析の後、Turkey-Kramer による多重比較を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 三叉神経節の免疫組織化学的観察

両側の三叉神経節を2%グルタルアルデヒド2%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定後に採取した。三叉神経節は Zamboni 固定液で後固定後 (4°C, 24時

Table 3. Time table of the examination

Examination \ Day	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Symptom score ¹⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Permeability ²⁾	+		+				+		
Immunohist. ³⁾	+		+				+		+
PCA ⁴⁾	+		+		+		+		+

Examinations were done according to this time table for 9 days from the beginning of OA inhalation. The examined day was marked as (+).

1) Symptoms of the guinea pigs were scored according to Takeda's score board.

2) Permeability of epithelial intercellular spaces was observed by using horseradish-peroxydase as a cytological tracer.

3) Immunohistological study was performed on the trigeminal ganglion with avidin-biotin peroxydase complex method for SP.

4) Passive cutaneous anaphylaxis reaction was performed to estimate the production of IgE.

間) パラフィン包埋をし、 $1\mu\text{m}$ で薄切し $10\mu\text{m}$ 毎の連続切片を作成、Hsu ら²⁰⁾の方法に準じて Avidin-biotin peroxidase complex 法によって免疫染色後再構築して観察した。免疫染色は一次抗体には抗 SP 抗体 (ケミサイエンス株式会社, 東京) を用い、二次抗体にはビオチン化抗家兎 IgG (vector lab., Burlingame, CA, USA) を用いた。

5. 観察期間及び日程

吸入感作 1 日目から 9 日目までを観察期間とし、症状スコアは毎日、鼻粘膜透過性は 1, 3, 7 日目に、PCA 価は 1, 3, 5, 7, 9 日目に、三叉神経節の免疫組織化学的検討は 1, 3, 7, 9 日目にそれぞれ観察測定を行った (表3)。

成 績

I. 三叉神経節の免疫組織学的観察

カプサイシンを投与せずヒスタミンも点鼻しない A 群とヒスタミンは点鼻した B 群では、すべての三

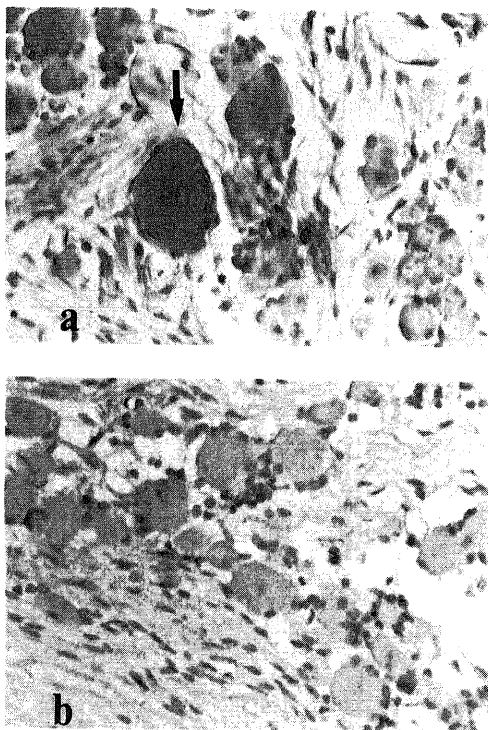


Fig. 1. Immunohistochemical micrographs of trigeminal ganglion of the guinea pig. (ABC method for anti SP, $\times 400$) a, Capsaicin non-treated animal; b, Capsaicin treated animal. SP containing cell (arrow) is observed in Fig. a, but not in b.

叉神経節内に SP 陽性細胞が40%程度認められた (図1-a)。これに対し、カプサイシンを投与し、ヒスタミンは点鼻しなかった C 群とヒスタミンも点鼻した D 群では著明な変形神経細胞は認められなかったが、全ての標本において SP 陽性細胞は消失していた (図1-b)。

II. 症状スコアの経日的推移の検討

鼻かき、身震い等の症状は吸入感作開始約 2 分後から、くしゃみ喘鳴発作は約 5 分後からみられた。その後、呼吸困難を示すモルモットも出現し、カプサイシンを投与していない A, B 群の中には横臥してしまうモルモットもみられた。喘鳴、呼吸困難は吸入終了後しばらくみられたが、吸入終了 2 時間後では消失していた。一方、カプサイシンを投与した C, D 群では鼻かき、軽度の喘鳴はみられたものの、くしゃみや呼吸困難はほとんどみられなかった。

症状スコアは全観察期間 (9 日間) を通して、カプサイシンを投与していない A, B 群と、カプサイシンを投与した C, D 群の間に有意差を認めた。吸入感作のみを行った A 群と、カプサイシン投与を行った C 群の吸入感作日毎の症状スコアを比較すると、A 群は 1 日目 1.0 ± 2.24 でその後、感作回数毎に漸増し、9 日目では 5.3 ± 1.34 と有意に上昇していたが、C 群では 1 日目 0.43 ± 0.49 と A 群よりも低い値を示し、観察期間中わずかな上昇を認めるが 9 日目でも 1.0 ± 0.71 と低い値を示した (図2-a)。このように SP の存在は抗原投与による症状の増悪に密接に関わることが明らかになった。吸入前にヒスタミンを点鼻した B 群の症状スコアは 1 日目から 5.7 ± 2.12 とヒスタミン点鼻のない A 群と比較して高く、9 日目では更に上昇しており (8.7 ± 0.71)、A 群との間に有意差を認めたことから、ヒスタミンは SP 存在下で有意に症状を増悪させると考えられた (図2-b)。しかしながら、ヒスタミンは知覚神経終末を刺激し末梢から SP を放出させることが知られているので、B 群の症状の増悪はヒスタミンと SP の相乗効果である可能性が考えられた。そこでカプサイシン投与、ヒスタミン点鼻の双方を行った D 群の症状スコアを検討すると 1 日目は 0.5 ± 0.5 、9 日目も 2.0 ± 0.71 と低く (図2-b)、またカプサイシン投与群間にはヒスタミン点鼻による有意差が認められず (図2-c)、A, B 群間に認められた様なヒスタミンによる症状スコアの上昇効果は認められなかった。このことから、B 群においてヒスタミン点鼻による症状の増悪はヒスタミンと SP の相乗効果であると考えられ、SP がアレルギー性鼻炎の症状に強く関与することが明らかになった。

Ⅲ. 鼻粘膜透過性の亢進に関する検討

無処置の正常モルモットでの細胞間隙への HRP の透過率は1.5% (3/200) と低く, HRP には透過性亢進の作用はなく, かつ HRP 点鼻の操作によっても透過性は亢進しない事が示唆された. 抗原吸入のみの A 群で1日目には細胞間隙への HRP 透過がほとんどみられず, 3日目で56.2% (191/340) の細胞間隙に HRP が透過した (図3). 抗原吸入の反復により更に透過性が亢進し, 7日目では66.7% (201/300) の細胞間隙に HRP が透過した (図4-a). カプサイシンを投与した C 群の HRP 透過率は1日目で1.9% (3/160), 3日目で2.3% (2/130), 7日目で2.1% (3/140) と低く, 全観察期間中, 正常モルモットと比較し有意差は認められなかった (図4-b). このことから鼻粘膜内の SP の消失は抗原吸入によって誘発される HRP の細胞間隙への

透過を強く抑制していることが明らかになった.

一方, ヒスタミンを点鼻した B 群での HRP 透過率は1日目から63.5% (127/200) で A 群の7日目のレベルに相当し, 3日目で65.4% (102/156), 7日目で72.3% (120/166) と更に透過率は亢進した. このようにヒスタミンは HRP の細胞間隙への透過率を亢進させると共に透過性亢進の機序成立までの期間を短縮していた. しかしながらヒスタミンにより知覚神経終末から SP が鼻粘膜へ放出されることが知られているので, ヒスタミンのみの細胞間隙透過性におよぼす影響を調べるため, カプサイシンを投与し, ヒスタミンを点鼻した D 群で観察した. HRP 透過率は1日目は3.0% (6/200) と低く, 正常レベルで SP 存在下のヒスタミンの効果と大きな差を示した. しかしながら, 3日目で49.0% (98/200), 7日目で52.7% (74/140) と透過性亢進がみられた. 7日目のレベルでは A 群での3日目のレベルに一致し, SP 消失による透過性亢進の機序成立の遅れを示した. このように鼻粘膜細胞間隙の透過性亢進に SP とヒスタミンがそれぞれ関与することが明らかになった.

Ⅳ. PCA 価測定による IgE 産生の評価

1日目の PCA 価は腹腔内 OA 抗原投与による IgE 産生の程度を示し, 全ての群で平均 PCA 価は5.29から6.06の間であり, 腹腔内感作による IgE 産生に有意な個体差を認めなかった.

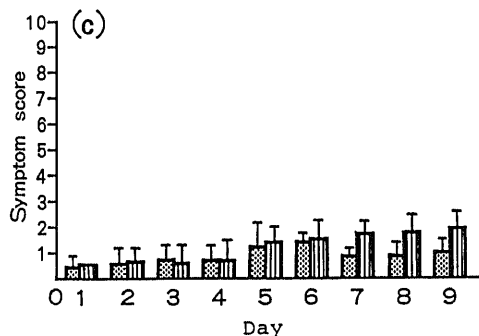
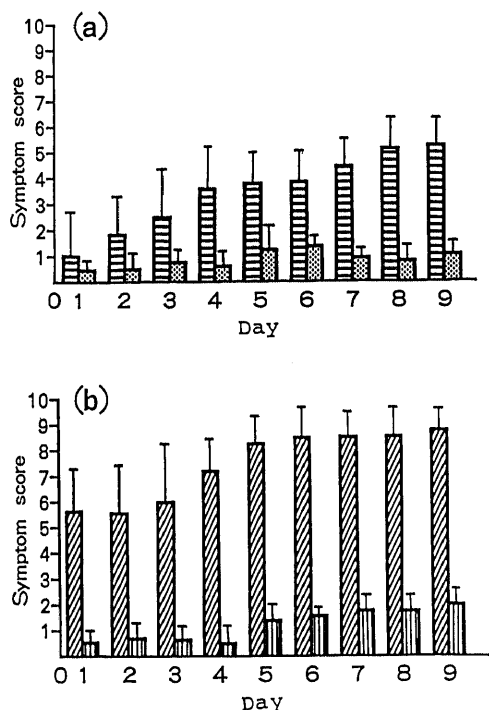


Fig. 2. Symptom score. Symptoms were observed for 10 min during an OA inhalation every day and scored according to Takeda's score board. □, Group A-animals were not injected with capsaicin before immunization by ovalubmin (OA) nor delivered histamine diphosphate before inhalation of OA. ▨, Group B-animals were not injected with capsaicin before immunization by OA but delivered 0.1mg of histamine diphosphate before inhalation of OA. ▩, Group C-animals were injected with capsaicin intracutaneously 950mg/kg for 5 days before immunization by OA but not delivered histamine diphosphate before inhalation of OA. ▪, Group D-animals were injected with capsaicin intracutaneously 950mg/kg for 5 days before immunization by OA and delivered 0.1mg of histamine diphosphate before inhalation of OA. Values were expressed as the mean±standard deviation. The figures a, b and c represent symptom scores of groups A and C, groups B and D, and groups C and D, respectively.

吸入による OA 抗原投与のみの A 群の PCA 値は 1 日目 (6.06 ± 0.49) から漸増し 9 日目では 32.0 ± 0.63 を示した。各日の PCA 値は前回の PCA 値と比較して有意に上昇しており、これは吸入の反復によって IgE 産生が徐々に増加した事を示唆していた。カプサイシンを投与した C 群では 3 日目の PCA 値 (6.73 ± 1.20) は 1 日目の PCA 値 (5.60 ± 0.5) と有意差がな

く、5 日目の PCA 値 (8.0 ± 0.83) において初めて有意差を認めた。また、3 日目以降、A 群との間に有意差を認め、これらの事から、SP の消失は抗原吸入による IgE 産生を遅延させ、かつ抑制することが明らかになった (図5-a)。

一方、ヒスタミンを点鼻した B 群の PCA 値は 3 日目に 19.56 ± 1.48 を示し、その後も上昇を続け 9 日目には 128.0 ± 0.0 に達した。3 日目以降 A 群と有意差を認め、ヒスタミン点鼻によって抗原吸入による IgE 産生が高まったと考えられた (図5-b)。カプサイシンを投与し、ヒスタミンを点鼻した D 群の PCA 値は、1 日目は 5.28 ± 0.50 であったがその後 9 日目は 18.0 ± 0.69 であり、この PCA 値は A 群の 5 日目、

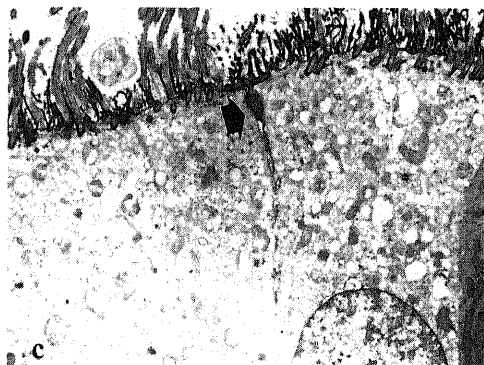
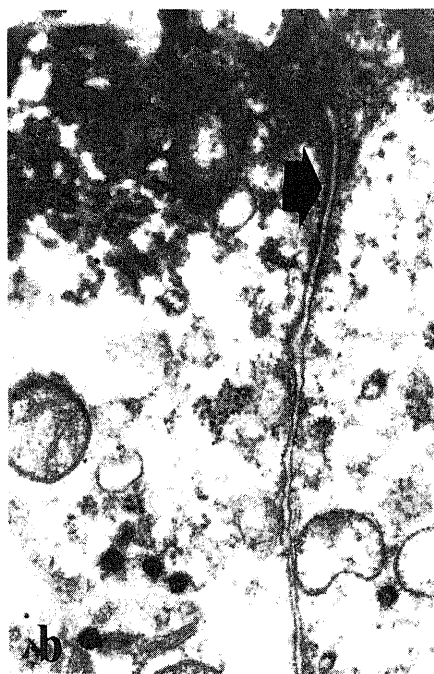
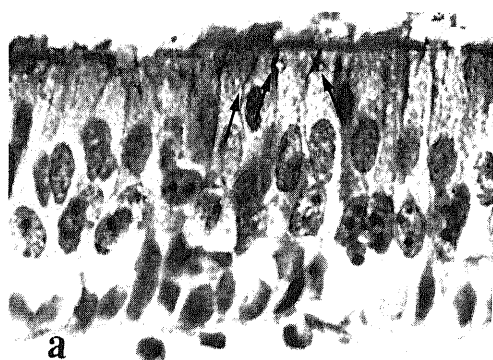


Fig. 3. a, Nasal mucosa of a guinea pig exposed to OA once a day for three days. HRP reaction products are observed in intercellular spaces (arrows). ($\times 400$). b, Electron micrograph of nasal mucosa of a normal guinea pig. There is no HRP reaction product in intercellular space (arrow). ($\times 12000$). c, Electron micrograph of nasal mucosa of a guinea pig exposed to OA once a day for three days. HRP reaction products were observed (arrow) in intercellular space ($\times 7000$), and positive intercellular space for HRP reaction products were seen (arrow) at high magnification (d, $\times 12000$).

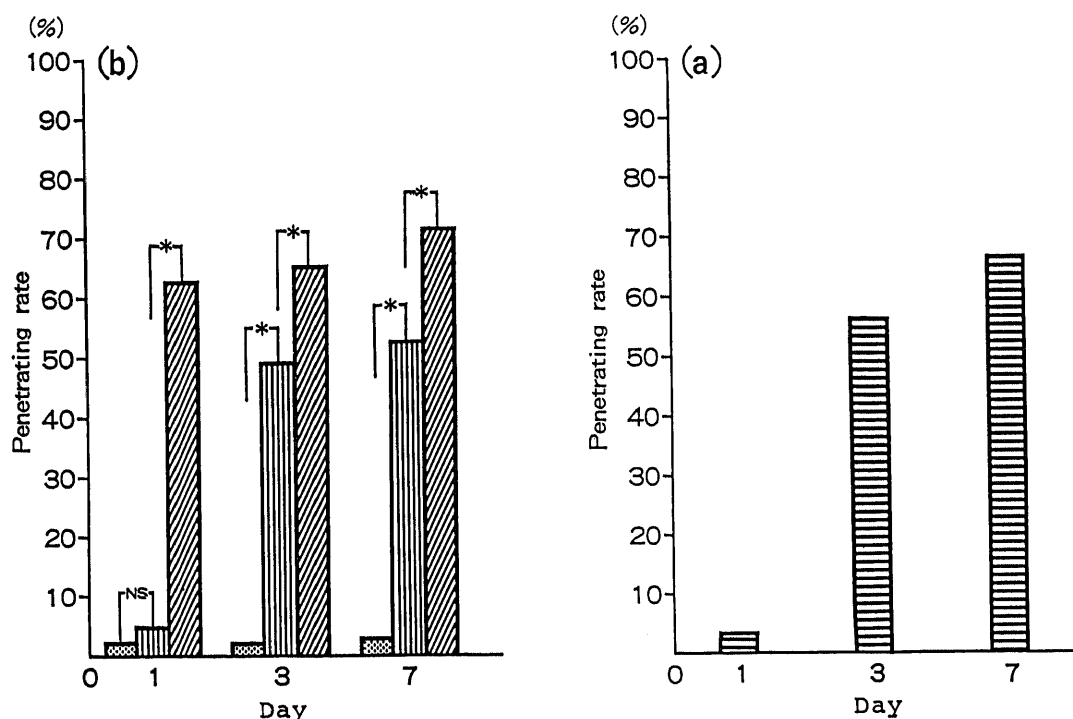


Fig. 4. Penetration rate of HRP reaction products into intercellular space. The rates of positive intercellular spaces for HRP reaction products (%) were calculated against the observed total spaces at the first, third and seventh day from the beginning of OA inhalation. The figures a and b represent the penetration rate of group A and groups B, C and D, respectively. (Groups A, B, C and D are the same groups explained in Fig.2) *, $P < 0.05$ between the two groups; NS, not significant.

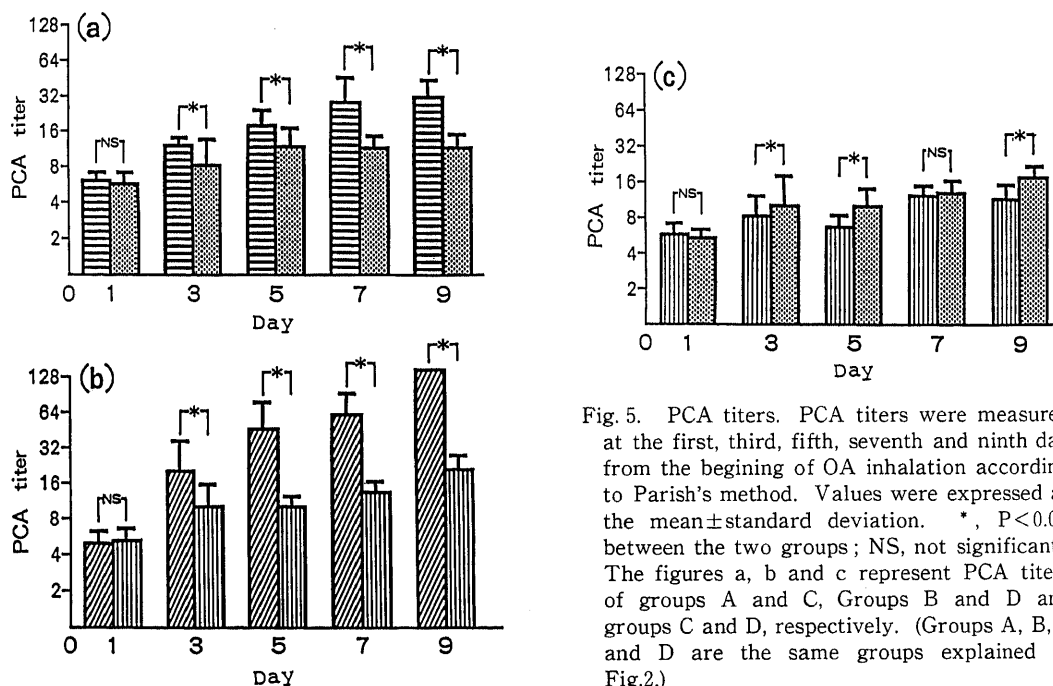


Fig. 5. PCA titers. PCA titers were measured at the first, third, fifth, seventh and ninth day from the beginning of OA inhalation according to Parish's method. Values were expressed as the mean \pm standard deviation. *, $P < 0.05$ between the two groups; NS, not significant. The figures a, b and c represent PCA titers of groups A and C, Groups B and D and groups C and D, respectively. (Groups A, B, C and D are the same groups explained in Fig.2.)

B 群の 3 日目に相当する値であった。カプサイシンを投与した 2 群を比較するとヒスタミンを点鼻しなかった C 群と点鼻した D 群では 3, 5, 9 日目には有意差を認めたが 7 日目には有意差を認めず、上昇傾向に有意差は認められなかった。B 群と D 群の PCA 値は 3 日目以降有意差を示し、IgE 産生に対するヒスタミンと SP の相乗効果が認められた。このように、SP あるいは SP 陽性知覚神経は吸入感作における IgE 産生に強く関与している事が認められた (図 5-c)。

考 察

ハートレー系のモルモットは、吸入感作でヒトの喘息に近い症状を示し、ヒスタミンに対する感受性も強い事²⁷⁾から、マウスと比較して抗体産生のばらつきは認められるもの²⁸⁾の気管支喘息やアレルギー性鼻炎のモデル動物として多く使用されており、本研究でも同系のモルモットを感作動物として使用した。Levine ら²⁹⁾は、少ない抗原量で繰り返し感作することが IgE 産生に効果的であると報告していることから、本研究のように低濃度の抗原吸入を繰り返し行う事は、アレルギー性鼻炎モデル動物を作成するのに最適である。吸入抗原の濃度は相馬ら³⁰⁾の方法に従って 1mg/ml とした。吸入感作時間は 1 分から 30 分間と報告により異なっていた^{30)~32)}が、予備実験で吸入開始 2 分後に症状を認め始め、10 分後には症状も安定し PCA 値も上昇していたので、吸入感作時間を 10 分間と決定した。腹腔内感作ではプロプラノロールの併用が有用であると報告されている³³⁾ので本研究でも使用した。

ヒスタミンの点鼻量は、鶴飼ら³⁴⁾がアレルギー性鼻炎モデルで細胞間隙の透過性亢進を報告した量に基づいて一側の鼻腔に磷酸ヒスタミン 0.1mg を点鼻した。予備実験で、正常なモルモットの一側に対して 0.1mg 点鼻し、点鼻 15 分には細胞間隙の透過性の亢進が認められることから、0.1mg のヒスタミンは感作モデルにおいても細胞間隙の透過性を亢進させるのに十分な量である。ヒスタミンを点鼻すると、約 2 分後からくしゃみ、鼻汁分泌、軽度の喘鳴が認められたが 15 分後には改善していた。よって点鼻 20 分後からの吸入感作の際の症状はすべて吸入によるものと考えてよい。

カプサイシンは全身投与により SP を枯渇させ、特異的に SP 陽性の知覚神経変性を起こす物質で交感神経、副交感神経に対しての毒性はないと報告されている^{35)~37)}。従って、カプサイシン投与動物は SP 陽性知覚神経のみが機能低下に陥り、自律神経系の機能は保たれているのでアレルギー性鼻炎における知覚神経の関与を検索するのに最適である。カプサイシンを全身

投与した時のカプサイシンの作用部位には量依存性があると報告³⁸⁾されているが、本研究で投与した合計 950mg/kg は武田が²⁹⁾モルモットにおいて鼻過敏症状の減弱を報告しており、少なくとも鼻粘膜の SP 陽性知覚神経の機能低下を誘発するには十分な量であると考えられる。三叉神経節における SP の免疫染色標本の観察でもカプサイシン非投与群でみられた 40% 前後の SP 陽性細胞が、この量のカプサイシン投与により観察全期間に渡り全ての標本において SP 陽性細胞は消失していることから、少なくとも三叉神経節内の SP やそれらが支配する末梢領域での SP を枯渇させるに十分な投与量と考えられる。カプサイシンを溶解した溶媒のみの投与群においては SP 陽性細胞の比率に変化は認められないので、SP 陽性細胞の消失はカプサイシンに特異的な作用と思われる。

HRP 自体は細胞間隙の透過性を亢進させず³⁹⁾、抗原物質と同様に高分子であることから、受動的に侵入容易な部位へ動く組織学的トレーサーとして用い、吸入による OA 抗原の鼻粘膜細胞間隙への侵入の程度を HRP の透過性で検討することは妥当であると思われる。本研究ではレクチンと結合していないフリー HRP を使用することにより、鼻粘膜の脂質とレクチンが結合し HRP の細胞間隙透過性が亢進する可能性を否定した。HRP の細胞間隙透過性の検討には充分量の HRP を投与することが必要であるが諸家の研究から投与量は一側 10mg とし、鼻腔に点鼻した。HRP 点鼻前に鼻腔内を生理食塩水で洗浄し、粘液や異物を除去して HRP を点鼻した。この洗浄操作は正常な粘液纖毛輸送系を多少障害する恐れがあるが上皮細胞の緻密接合には影響を与えない事は正常動物での HRP 透過性が低いことから問題はなく、同時に緻密接合以外の粘液などによる HRP 透過の抑制効果を除外することもできた。HRP 点鼻後灌流固定を行うまでの時間も透過性の検討には重要である。増田⁴⁰⁾によると正常モルモットの鼻粘膜では HRP 点鼻後 30 分で細胞嚥下作用により細胞質内に HRP を認め、点鼻後 45 分で細胞質内から細胞間隙に HRP を認め鼻粘膜上皮細胞間隙の透過性の亢進以外の機序による細胞間隙の HRP を指摘している。そこで、本研究では HRP 点鼻後 15 分で灌流固定を行った。固定液はグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドの混合液を用いたが、HRP の失活も認められず固定力低下によって起こり易い上皮の基底層からの剝離を防止した。HRP 透過率を算定するにあたり光学顕微鏡下で部位による透過率のばらつきを少なくするため無作為に選んだ 6~10 視野で細胞間隙を観察し、その中で

HRP 反応物質が認められる細胞間隙の数を観察細胞間隙の数で割って各群の透過率を算出した。本研究では HRP 透過率を 1, 3, 7 日と経時的に観察し透過性亢進の機序成立までの時間と透過率の経時変化を検討したが、今までこのような経時的観察は I 型アレルギーモデルでの研究においては報告されておらず、細胞間隙透過性の機序の考察に重要である。

PCA 反応は皮膚感作性を持つ抗体の検出に最も敏感な反応で、種々の免疫学的研究で広く利用されている。例えば感作動物での産生抗体量の決定や、抗体産生に有効な抗原構造の決定等に必要な方法として高く評価されている⁴¹⁾。特にモルモットの I 型アレルギー反応の特異的抗体検出の方法としての評価は高い。それはモルモット血清中の同種細胞親和性抗体としては IgE と IgG1 の 2 種類が確認されているが、IgG1 は血清の皮下注入から 2～7 日で注入部位の組織から遊離してしまうのに対し IgE は 2 週間程度安定で⁴²⁾、両者の組織内安定期間にずれが生じ IgE を特異的に検出することが可能であることによる。本研究では希釈血清を皮下注入後 8 日目で PCA 反応を実施し PCA 価を測定した。よって、本研究での結果は I 型アレルギー反応に特有の IgE 産生の程度を示すと考えられる。

武田ら²³⁾は TDI 感作による鼻過敏症モルモットで、また国米ら⁴³⁾はアレルギー性鼻炎モルモットで、共にカプサイシン処置群の症状スコアの低下を報告した。本研究においてもカプサイシンを投与した C 群は吸入感作のみを行った A 群と比較して明らかに症状の減弱を認め、前二者の結果を確認し、更にアレルギー性鼻炎の症状発現に対する知覚神経の関与を検討した。アレルギー性鼻炎の症状のうち、くしゃみは知覚神経反射であるが、水様性鼻汁分泌に対しては副交感神経系の関与の他、ヒスタミン等の I 型アレルギーによって放出される化学伝達物質の局所作用によるものと考えられている。それ故、ヒスタミン投与群においては容易に鼻症状が増悪し、症状スコアが上昇することが推測され、本研究においても上昇した (図 2-b)。しかしながらカプサイシンを投与し鼻粘膜内及び三叉神経節内の SP が消失した状態ではヒスタミンによる鼻症状の増悪は認められなかった。このようにアレルギー性鼻炎モデルにおいては SP 存在下でヒスタミンにより反応の増悪を認める一方、カプサイシン投与によって SP 陽性知覚神経系が機能しないモルモットにヒスタミンを点鼻した場合には、ヒスタミンが存在し、かつ吸入感作の繰り返しにより I 型アレルギー反応が起こると考えられるにもかかわらず症状が減弱す

る事から、アレルギー性鼻炎の症状は主に知覚神経系の反射によって起こると考えられた。また SP 存在下でアレルギー性鼻炎モデルにヒスタミンを点鼻することで反応の増悪が認められ、知覚神経反射が機能するモデルにおいてはヒスタミンによってその症状が増悪されることが明らかになった。

吸入感作のみを行った群 (A 群) での透過性亢進は 3 日目以前 (吸入感作直後、2 時間後、吸入感作 2 日目) には認められず、3 日目に初めて細胞間隙に HRP 反応物質が認められ (56.7%)、7 日目で 66.7% と透過率が亢進している事と、Boucher らの正常モルモットにヒスタミン投与後 20 分で細胞間隙透過性亢進を認める観察結果とを合わせ、I 型アレルギー反応による透過性亢進の時間経過を考察すると初期の吸入感作だけではヒスタミン量が低値であることが推測され、感作回数毎にヒスタミン量が増加し 3 日目で透過性亢進が発現すると考えられる。しかし I 型アレルギー反応による遊離ヒスタミンが知覚神経終末を刺激し、知覚神経を介するアレルギー反応の増強機構が存在するのでカプサイシンを投与し鼻粘膜や知覚神経細胞内の SP を消失させた C 群で観察した結果、細胞間隙の透過性は亢進しなかった (図 4-b)。このように鼻粘膜内および知覚神経細胞内の SP の消失は症状スコアの低下と共に細胞間隙の透過性亢進を抑制しており、アレルギー性鼻炎における症状並びに細胞間隙の透過性亢進に SP 陽性知覚神経系の関与を強く示唆している。しかしながら、カプサイシンを投与しヒスタミンも同時に点鼻した D 群における細胞間隙透過性は、ヒスタミン点鼻のみの B 群と比較すると 1 日目ではカプサイシンのみを投与した C 群同様に有意に低い。このように、アレルギー性鼻炎における細胞間隙の透過性亢進は先に考察したヒスタミンよりも SP の影響が強いことが明らかである。一方、D 群での 3 日目、7 日目の細胞間隙透過率はヒスタミンのみを投与した B 群よりも低いものの、カプサイシン投与のみの C 群よりも有意に高くなった事から、アレルギー性鼻炎の鼻粘膜上皮における細胞間隙の透過性亢進には SP が関与する機序とヒスタミンが関与する遅延性の機序が独立して存在することが考えられる。

アレルギー性鼻炎においては免疫系に捕捉される一定量以上の抗原と感作回数が IgE 産生に必要である事は、本研究の OA のみを投与した A 群における細胞間隙透過性亢進と PCA 価の上昇が時間的ずれがあるものの平行した関係にある事から明らかである (図 3-a, 図 4-a)。一方、カプサイシン投与により SP 陽性知覚神経細胞並びに末梢で SP を消失させた C 群では

細胞間隙の透過性は亢進せず、PCA 価は吸入感作の反復によりわずかに上昇を示すが、吸入感作時の嚥下作用による消化管内感作の結果、消化管でも IgE 産生が行われる事を考慮すると、鼻局所への抗原吸入暴露による IgE 産生の増加は認められない。この結果は細胞間隙透過性と IgE 産生との間に曖昧な呼応関係がある事を示すが、カプサイシンを投与しヒスタミンを点鼻した D 群では 3 日目、7 日目と細胞間隙の透過性が有意に亢進するにもかかわらず、PCA 価の上昇は C 群での抗原嚥下作用による上昇との間に安定した有意差を認めず (図4-C)、細胞間隙透過性亢進や感作回数と IgE 産生には呼応関係はなく、むしろ SP 陽性知覚神経の関与が強い事を示す。このように本研究により、SP 陽性知覚神経もしくは鼻粘膜内の SP がアレルギー性鼻炎において IgE 産生に細胞間隙の透過性亢進や感作回数よりも重要な役割を果たす事を示唆したが、この IgE 産生に対する効果が SP 陽性知覚神経を介した中枢神経系や自律神経系も関与する免疫効果なのか、単に鼻粘膜での SP による反応であるかはこれから先の研究成果に期待するところである。

結 論

アレルギー性鼻炎モデルにカプサイシンの全身投与とヒスタミン点鼻の処置を組合わせる事によって SP および SP 陽性知覚神経細胞のアレルギー性鼻炎への関与を検討した。

1. 抗原吸入時の鼻症状はカプサイシンを投与しなかった A, B 群では、吸入回数の増加に伴って症状スコアは上昇していったがカプサイシンの全身投与を行った群では上昇率は低く、カプサイシン投与群にヒスタミンの点鼻を加えても有意な上昇を認めなかった。よってアレルギー性鼻炎の鼻症状はほとんどが SP 陽性知覚神経反射によるものと考えられる。

2. 吸入感作のみを行った A 群では吸入 3 日目に初めて鼻粘膜細胞間隙の透過性が亢進し (56.2%)、7 日目には 66.7% と更に上昇した。カプサイシン全身投与、ヒスタミン非点鼻 C 群では、SP 消失により、この透過性亢進が全観察期間を通して抑制された (3 日目、6.2%; 7 日目、8.6%)。カプサイシンを投与し、ヒスタミンを点鼻した D 群でも 1 日目の透過率は 3.0% で上昇せず、細胞間隙の透過性亢進の機序に SP が大きく関与している事が認められた。D 群はまた、3 日目には 49.0% と透過性が亢進し、7 日目には 52.7% と上昇していた。これは SP 消失時のヒスタミンによる細胞間隙の透過性亢進の機序であり、SP が存在している際にヒスタミンを点鼻した B 群と比較

して透過性亢進の成立が遅延しており、かつ有意差を認めた。よって SP を介さないヒスタミンによる透過性亢進は遅延型であると考えられる。

3. 吸入感作のみを行った A 群の PCA 価は抗原吸入の反復により 3 日目で降有意に上昇し、9 日目には 32 ± 0.63 を示した。ヒスタミン点鼻を行った B 群では上昇傾向が強く、9 日目には 128.0 ± 0.0 にまで達し、SP 存在下にヒスタミンが IgE 産生を促進することが明らかになった。一方、カプサイシン全身投与と群 (C 群) では 5 日目にはじめて有意に上昇したが、9 日目では 11.3 ± 0.5 と A 群と有意差を認め、吸入時に抗原を嚥下したことによる消化管系の機能を考慮すると鼻局所での抗原被曝による IgE 産生は認め難く、SP 消失によって IgE 産生が低下していることを示した。カプサイシン投与、ヒスタミン点鼻群 (D 群) では、9 日目 PCA 価は 18.0 ± 0.69 であり、C 群との間に安定した有意差を認めず、透過性が亢進しても SP 消失時には IgE 産生が低下することが認められ、アレルギー性鼻炎における IgE 産生に SP もしくは知覚神経系が深く関与していると考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師古川 保教授、梅田良三名誉教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、ご指導を賜りました金沢大学医学部第三解剖学講座工藤基教授、尾小山茂雄助手、並びに統計学的検討に際し貴重な御助言を賜りました金沢大学医学部衛生学講座橋本和夫教授、本研究遂行にあたり御協力を頂いた耳鼻咽喉科学講座諸兄に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Inoue, S. & Hogg, C. J.: Intercellular junctions of the tracheal epithelium in guinea pigs. *Lab. Invest.*, **31**, 68-74 (1974).
- 2) Richardson, J., Bouchard, T. & Ferguson, C. C.: Uptake and transport of exogenous proteins by respiratory epithelium. *Lab. Invest.*, **35**, 307-314 (1976).
- 3) Richardson, J., Hogg, C. J., Bouchard, T. & Hall, L. D.: Localization of antigen in experimental bronchoconstriction in guinea pigs. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **52**, 172-181 (1973).
- 4) Boucher, C. R., Ranga, V., Pare, D. P., Inoue, S., Moroz, A. L. & Hogg, C. J.: Effect of histamine and methacholine on guinea pig tracheal permeability to HRP. *J. Appl. Physiol.*, **45**, 939-948 (1978).

- 5) Rhodes, R. S. & Karnovsky, M. J.: Loss of macromolecular barrier function associated with surgical trauma to the intestine. *Lab. Invest.*, **25**, 220-229 (1971).
- 6) Hirano, A., Becker, N. H. & Zimmerman, H. M.: The use of peroxidase as a tracer in studies of alternations in the blood-brain barrier. *J. Neurol. Sci.*, **10**, 205-213 (1970).
- 7) Simani, S. A., Inoue, S. & Hogg, C. J.: Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke. *Lab. Invest.*, **31**, 75-81 (1974).
- 8) Boucher, R. C., Pare, P. D., Gilmore, J. N., Moroz, A. L. & Hogg, C. J.: Airway mucosal permeability in the ascaris suum-sensitized rhesus monkey. *J. Allergy clin. Immunol.*, **60**, 134-140 (1977).
- 9) Inagaki, M.: Electron microscopic studies on the tight junctional permeability of the human nasal mucosa. *Mie Med. J.*, **33**, 407-417 (1984).
- 10) 鮫島靖浩, 増山敬祐, 北尾友幸, 石川 哮: 実験的鼻アレルギーモデルにおける鼻粘膜上皮のフリーズ, フラクチャー法による観察. *日鼻誌*, **26**, 138-139 (1987).
- 11) 金 春順, 鶴飼幸太郎, 坂倉康夫, 山田弘之, 増田佐知子: 鼻アレルギーによる鼻粘膜の複合糖質-レクチンによる電顕組織化学. *日耳鼻*, **92**, 709-715 (1989).
- 12) Widdicombe, J. G.: Reflex control of breathing. In A. C. Guyton (ed.), *MTP International Review of Science, Respiratory Physiology*, 1st ed. p1273-303, Butterworth, London, 1974.
- 13) Lundberg, J. M., Martling, C. R. & Hokfelt, T.: Airways, oral cavity and salivary glands: classical transmitters and peptides in sensory and autonomic neurons. In A. Bjorklund, T. Hokfelt & C. Owman (eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. 1st ed. p1391-1407, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- 14) Buck, H. S. & Burcher, E.: The tachykinins: a family of peptides with a brood of 'receptors'. *Trends Pharmacol. Sci.* **7**, 65-68 (1986).
- 15) Holzer, P., Bucsus, A. & Lembeck, F.: Distribution of capsaicin-sensitive nerve fibers containing immunoreactive substance P in cutaneous and visceral tissues of the rat. *Neurosci. Lett.*, **31**, 253-257 (1982).
- 16) Lundberg, J. M., Lundblad, L., Martling, C.-R., Saria, A., Stjarne, P. & Anggard, A.: Coexistence of multiple peptides and classic transmitters in airway neurons: Functional and pathophysiologic aspects. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **136** 16-22 (1987).
- 17) Widdicombe, J.: Nervous receptors in the respiratory tract and lungs. In T. Hornbein (ed.), *Lung Biology in Health and Disease, Regulation of Breathing*, 1st ed. p1439-1472, Butterworth, London, 1981.
- 18) Stjarne, P., Lundblad, L. & Anggard, A.: Capsaicin and nicotine-sensitive afferent neurones and nasal secretion in healthy human volunteers and in patients with vasomotor rhinitis. *Br. J. Pharmacol.*, **96**, 693-701 (1989).
- 19) Lundblad, L.: Protective reflexes and vascular effect in the nasal mucosa elicited by activation of capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive trigeminal neurons. *Acta Physiol. Scand.* (suppl), **529**, 1-42 (1984).
- 20) Lundberg, J. M., Martling, C. R. & Lundblad, L.: Cigarette smoke-induced irritations in the airways in relation to peptide-containing, capsaicin-sensitive sensory neurons. *Klin. Wochenschr.*, **66** (suppl. X I), 151-160 (1988).
- 21) 武田憲昭: 鼻過敏症と神経ペプチド. *日鼻誌*, **27**, 311-314 (1989).
- 22) 阿部能之, 武田憲昭, 入船盛弘, 荻野 敏, 松永亨, 今村育男, 和田 博: TDI 感作モルモット症状誘発における知覚神経の関与. *日鼻誌*, **29**, 122 (1990).
- 23) 谷栄一郎, 増山敬祐, 国米秀幸, 石川 哮, 遠山正彌: ヒスタミンによる知覚神経内ペプチドへの影響について-免疫組織化学的研究-. *免疫アレルギー*, **8**, 58-59 (1990).
- 24) Graham, R. C. & Karnovsky, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney; ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 291-302 (1966).
- 25) Parish, W. E.: Homologous serum passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs mediated by two γ I or γ 1-type heat-stable globulins and a non- γ I heat-labile reagin. *J. Immunol.*, **105**,

1296-1298 (1970).

26) Hsu, -M. S., Raine, L. & Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques; A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 577-581 (1981).

27) 伊藤幸治: 実験的気管支喘息. *臨床免疫*, **15**, 292-301 (1983).

28) Ovary, Z., Kaplan, B. & Kojima, S.: Characteristics of guinea pig IgE. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **51**, 416-428 (1976).

29) Levine, B. B., Chang, J. H. & Vaz, M. N.: The production of hapten-specific reaginic antibodies in the guinea pig. *J. Immunol.*, **106**, 29-33 (1981).

30) 相馬新也, 朝倉光司: 実験的鼻アレルギーの確立と鼻粘膜における β -Adrenargic Receptor の検討. *札幌医誌*, **55**, 161-175 (1986).

31) 山下敏夫, 北尻雅則, 友田幸一, 八倉隆保: 実験的 I 型鼻アレルギー (第一報 病理組織学的観察). *日耳鼻*, **84**, 251-256 (1981).

32) Imai, T., Shimizu, F., Fujimaki, H. & Watanabe N.: Enhancement of IgE antibody production by ovalbumin aerosol in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **70**, 368-372 (1983).

33) Nakazawa, H., Hobbay, J., Townley, R. & Chaperan, E.: Effect of β -adrenergic blockade, pertussis vaccine and Freund's adjuvant on reaginic antibody response in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **53**, 197-205 (1977).

34) 鶴飼幸太郎, 金 春順, 坂倉康夫: 鼻アレルギーモルモット鼻粘膜透過性に関する電顕的検討. *日鼻誌*, **29**, 42 (1990).

35) Jancso, G., Kiraly, E. & Jancso-Gabor, A.: Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary neurones. *Nature*, **270**, 741-743 (1977).

36) Gamse, R., Molnar, A. & Lembeck, F.: Substance P release from spinal cord slices by capsaicin. *Life Sci.*, **25**, 629-636 (1979).

37) Furness, I. B., Papka, R. E., Della, N. G., Costa, M. & Eskay, R. L.: Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea-pigs. *Neuroscience*, **7**, 447-459 (1982).

38) Nagy, J. I., Iversen, L. L., Goedert, M., Chapman, D. & Hunt, S. P.: Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *J. Neurosci.*, 399-406 (1983).

39) 大平裕子, 高坂知節, 沢井高志: 水注入後における鼻粘膜上皮透過性の経時的変化について. *日耳鼻*, **91**, 2003-2010 (1988).

40) 増田玄彦: 鼻粘膜上皮の透過性に関する電子顕微鏡的研究. *耳鼻咽喉科*, **29**, 388-401 (1983).

41) Ovary, Z.: Immediate reaction in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. *Prog. Allergy*, **5**, 459-508 (1958).

42) 国米秀幸, 増山敬祐, 石川 哮, 今村隆寿, 神原武: 鼻アレルギーにおける神経ペプチド Substance P の関与について. *日鼻誌*, **29**, 241 (1990).

Studies on the Role of Substance P in Nasal Allergy Chiiko Kato, Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **100**, 127—140 (1991)

Key words nasal allergy, substance P, permeability of nasal mucosa, IgE

Abstract

The present study was performed to elucidate the role of the sensory nerve and its neurotransmitter, substance P (SP), in the mechanism of nasal allergy. Immunization was performed on guinea pigs by intraperitoneal injections of ovalubmin (OA) with dl-propranolol, followed by OA inhalation. Before immunization, capsaicin was injected intracutaneously to some guinea pigs to degenerate the sensory neurons by exhausting of SP. The allergic symptoms, permeability of nasal mucosa and production of IgE against OA in the capsaisin pre-treated group was compared with those in the non-pre-treated group. Allergic symptoms were observed by scoring the degree of sneeze, watery secretion, cyanosis and stridor during the inhalation of OA. The permeability of the intercellular spaces was observed by using horseradish-peroxydase (HRP) as a cytochemical tracer. The passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction was studied to estimate the selective IgE production. In addition, each of the two groups was divided into two subgroups; histamine was administered nasally to one subgroup before OA inhalation and the other subgroup did not receive histamine. Allergic symptoms were not observed in the capsaisin pre-treated group, and the treatment with the allergic chemical mediator, histamine, didn't change the symptom scores. These results show that allergic symptoms in the nose result from a reaction of the sensory nerves to an allergen, rather than a release of histamine. The permeability of the nasal mucosa of the sensitized animals was higher in the capsaisin non-treated group than in that of non-sensitized animals. On the other hand in the capsaisin-pre-treated group the enhancement of the permeability of the nasal mucosa was not observed without the delivery of histamine. In the capsaisin-pre-treated and histamine delivered group, enhancement of the permeability was observed on the third day following OA inhalation and the permeability was lower than that of the capsaisin non-treated group. These results indicate that the permeability is enhanced by SP. PCA titers in the capsaisin-pre-treated group were significantly lower than those in the non-treated group. In the capsaisin pre-treated and histamine delivered group the PCA titers were not increased, although permeability of the nasal mucosa was enhanced on the third day after OA inhalation. These results indicate that SP participates in IgE production without the enhancement of mucosal permeability. This reveals that SP and the sensory nerves play an important role in the mechanism of nasal allergy.